

## 教学研究

# 组织透明技术在植物解剖学和植物发育生物学 实验教学中的应用

李桂忱 刘兵 杨泽云 孙爽莉 门淑珍\*

(南开大学生命科学学院植物生物学和生态学系, 天津 300071)

**摘要** 整体组织透明和组织切片技术是研究植物组织和器官的结构及其发育过程的常用实验手段。该文针对本科生植物学课程的侧根、胚珠(特别是胚囊)以及胚胎发育内容设计了相应的实验教学课程。该实验以拟南芥幼苗、不同发育时期的花蕾和种子为材料, 经固定、脱色和组织透明, 利用正置显微镜观察侧根、胚珠以及胚胎的发育过程。根组织经透明后, 在显微镜下可以清晰地观察到从侧根原基的建成到侧根发生的八个发育阶段。各个发育时期的胚珠经组织透明后, 在显微镜下可以清晰地观察到大孢子母细胞、功能性大孢子(FG1期)以及FG2~FG7期的胚囊。各个发育时期的种子经透明后, 在显微镜下可以清晰地观察到胚胎发育的1细胞期、8细胞期、球形期、心形期、鱼雷期、拐杖期和成熟期。这些实验结果可以使学生对拟南芥等双子叶植物的侧根、胚珠以及胚胎发育过程有较为系统的了解。该实验方法在其他较小的双子叶植物中也适用。

**关键词** 组织透明; 侧根; 胚珠; 胚; 拟南芥

## The Application of Tissue Clearing Technology in Experimental Course of Plant Anatomy and Plant Developmental Biology

LI Guichen, LIU Bing, YANG Zeyun, SUN Shuangli, MEN Shuzhen\*

(Department of Plant Biology and Ecology, College of Life Sciences, Nankai University, Tianjin 300071, China)

**Abstract** Whole-mount tissue clearing and tissue section are useful techniques in plant anatomical and developmental researches. This paper designed an experimental course for undergraduate students to understand the developmental processes of plant lateral root, ovule (especially the embryo sac) and embryo. In this experiment, *Arabidopsis* seedlings, flower buds and seeds at different developmental stages were fixed, depigmented, and cleared. Then the cleared samples were observed under a microscope to identify lateral root, ovule and embryo at different developmental stages. After the root was cleared, eight developmental stages of the lateral root primordium from the formation of short initial cells to the emergence of the lateral root could be clearly observed under the microscope. After the ovules at sequential developmental stages were cleared, the megaspore mother

收稿日期: 2020-09-10 接受日期: 2020-12-07

国家自然科学基金(批准号: 31870230、31570247)资助的课题

\*通讯作者。Tel: 022-23500856, E-mail: shuzhenmen@nankai.edu.cn

Received: September 10, 2020 Accepted: December 7, 2020

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.31870230, 31570247)

\*Corresponding author. Tel: +86-22-23500856, E-mail: shuzhenmen@nankai.edu.cn

URL: <http://www.cjcb.org/arts.asp?id=5487>

cell, functional megaspore (FG1 stage) and embryo sacs at FG2 to FG7 stages could be clearly observed under the microscope. After the seeds at sequential developmental stages were cleared, embryos at the 1-cell stage, 8-cell stage, globular stage, heart stage, torpedo stage, bent stage and mature stage could be clearly observed under the microscope. This course will enable students to have a more systematic understanding of the lateral root, ovule and embryonic developmental processes of *Arabidopsis* and other dicotyledonous plants. This experiment is also suitable for other small-sized dicotyledonous plants.

**Keywords** tissue clearing; lateral root; ovule; embryo; *Arabidopsis*

目前对于模式植物拟南芥组织器官的发育过程研究得较为清楚,这是借助了器官组织透明和组织切片的技术。器官组织透明和组织切片是研究植物组织和器官的结构及其发育过程的常用实验手段,近年来,许多关于植物发育方面的研究均采用了组织透明与组织切片技术<sup>[1-3]</sup>。

本科生植物学实验内容大部分是对根、茎、叶等器官的观察,对植物细胞、组织的观察也仅局限于徒手切片,内容较为单薄。为了配合本科生植物学理论课“植物发育”一节的教学内容,我们设计了利用组织透明技术观察模式植物拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)的侧根、胚珠及胚胎发育过程的实验课。该实验可以使学生更加直观地了解双子叶植物侧根、胚珠及胚胎的发育过程,加深对理论知识的理解。

## 1 实验原理

在一系列物质和能量代谢的基础上,种子开始萌发,根、茎、叶逐渐生长,直至开花结果,衰老死亡。在植物的生命周期中,其生长发育受到内部和外部因子的共同调节。不同器官对植物生长发育的贡献也是不尽相同的,其中植物的根系起支撑和固定植株的作用,同时,还可以从土壤中吸收植物生长所需的矿物元素、无机盐和水分等,以满足地上部分生长发育的需求。植物的根系由两种不同类型的根组成:由胚根发育形成的主根以及胚后发育形成的侧根和不定根<sup>[4]</sup>。侧根起始于中柱鞘的侧根建成细胞(founder cell),建成细胞首先进行垂周分裂形成单细胞层,而后经过平周分裂形成双层细胞,然后经过平周以及垂周分裂形成凸起的结构,即侧根原基。侧根原基接着进行分裂分化,最终突出表皮形成侧根<sup>[5-7]</sup>。

植物的生殖生长起始于花的发育,位于花最内轮的雌蕊,是被子植物的雌性生殖器官。雌配子体在雌蕊的胚珠中生长发育,它的发育分为八个时期。

胚珠中心有一个具有分生能力的细胞,被称为珠心;珠心细胞分裂形成珠心原基;珠心原基顶端的一个细胞会分化形成一个孢原细胞,被称为大孢子母细胞(megaspore mother cell, MMC);大孢子母细胞经过减数分裂形成四个大孢子,其中仅有一个能存活下来,被称为功能性大孢子(functional megaspore, FM),其余三个均发生退化;此时,珠心外面的两层细胞,即珠被,开始伸长,慢慢包围珠心,两侧珠被留下的小孔,我们称之为珠孔,另一侧为合点端。而后功能性大孢子进行有丝分裂产生具有八个细胞核的细胞,再经过细胞核的迁移以及细胞化,形成七细胞八核的胚囊(embryo sac);最后,经过核融合以及细胞退化,形成含有四个细胞的成熟雌配子体<sup>[8-10]</sup>。在开花植物的双受精过程中,来自父本的两个精细胞分别与母本雌配子体的卵细胞和中央细胞结合形成合子胚和胚乳,合子胚经过一系列的细胞分裂与分化发育成具有子叶、茎尖分生组织、下胚轴和根尖分生组织的成熟胚<sup>[11-12]</sup>。

组织透明技术是利用二甲苯、苯酚或者水合氯醛等透明剂将组织和细胞的内容物去除,增加实验材料的透明度,便于利用光学显微镜进行观察<sup>[13-15]</sup>。最常用的透明剂是二甲苯,二甲苯的透明效果较好、价格便宜,常在石蜡切片过程中使用,但刺激性较强,对人体有一定的毒副作用<sup>[16]</sup>。本文使用的水合氯醛不仅刺激性较小,还能达到很好的透明效果。我们将拟南芥的幼苗、不同发育时期的花蕾和种子置于水合氯醛溶液中透明,然后利用显微镜微分干涉差(differential interference contrast, DIC)模式观察其侧根、胚珠和胚胎的形态以及其发育过程。

## 2 教学设计与安排

### 2.1 教学目的

开设本实验的目的是使本科生学习和掌握组

织透明的方法,用该方法对模式植物拟南芥的侧根、胚珠和胚胎的发育过程以及形态进行观察。同时,在实验过程中熟悉和掌握制片方法和显微镜的使用方法。

## 2.2 教学的重点与难点

本实验的教学重点是使本科生学习并熟练掌握植物组织整体透明技术,并对侧根、胚珠和胚胎的发育过程以及各个时期的器官形态有一个完整的认识。教学难点是在观察胚珠发育的实验中,必须从幼嫩的雌蕊中解剖出胚珠,且由于发育早期的胚珠较小,需要在60×油镜下观察,操作难度系数较高。

## 2.3 实验材料与设备

2.3.1 实验材料 实验材料为野生型拟南芥哥伦比亚生态型(Columbia-0, Col-0)。

2.3.2 实验仪器和用具 实验仪器和用具包括:奥林巴斯高级正置显微镜(Olympus, bx63, 日本)、体式显微镜(Leica, 德国)、12孔板、移液器、吸头、载玻片、盖玻片和镊子等。

## 2.4 教学安排

2.4.1 学时安排 本实验可分为四个阶段,可根据学生的水平,选择由学生完成全部或者其中的部分实验:(1)配制所需试剂(4学时);(2)拟南芥幼苗侧根的固定透明及显微镜观察(12学时);(3)解剖不同时期的花,完整地取出雌蕊并将其固定透明,透明完成后进行解剖和制片,对胚珠进行显微镜观察(12学时);(4)解剖不同时期的角果,完整地取出种子并将其固定透明,透明完成后制片,对胚进行显微镜观察(12学时)。

2.4.2 课前准备 涉及侧根的实验必须提前10天进行拟南芥种子的消毒和播种,涉及胚珠和胚的实验必须提前6~8周播种野生型拟南芥Col-0。提前购买实验中所需固定剂和透明剂等相关试剂。

2.4.3 学生分组 可根据教研室条件将学生每2~4人分为一个小组,组员之间协调配合,共同完成实验步骤,分析实验结果,整理实验数据,并展开讨论。

## 3 实验步骤

### 3.1 拟南芥种植(由指导老师或助教完成)

3.1.1 拟南芥种子的消毒和无菌苗的培养(为观察侧根实验准备材料) 将所需拟南芥种子置于1.5 mL

离心管中,于超净工作台中加入1 mL 70%乙醇,室温放置5 min,其间反复颠倒混匀。弃去70%乙醇,加入1 mL 1%次氯酸钠溶液(用无菌水配制),室温放置10 min,其间反复颠倒混匀。弃去1%次氯酸钠溶液,加入无菌蒸馏水清洗3~4遍。最后加入1 mL无菌蒸馏水,置于4 °C冰箱2~3天。然后将消毒后的种子播种到MS固体培养基上,垂直培养7天。

配制100 mL MS培养基:称取0.44 g MS粉末(购自Sigma公司或者Duchefa公司)、1 g蔗糖、0.05 g MES(pH缓冲剂),待充分溶解后,用ddH<sub>2</sub>O定容至100 mL,用1 mol/L的KOH调pH至5.8。称取0.8 g植物琼脂(plant agar)加入上述溶液中。于121 °C高温高压条件下灭菌20 min后,在超净工作台中将培养基倒入无菌平皿中,待培养基冷却凝固后,进行后续操作。

3.1.2 培养拟南芥植株(为观察胚珠和胚发育实验准备材料) 将营养土与蛭石按3:1比例混合,加入适量水,将拌好的营养土装入培养盒。取拟南芥种子撒在培养盒的四个角,注意不要撒得太密集。随后,用保鲜膜盖到培养盒的表面,使其保持环境湿润,并将其放入温室或者培养箱中培养,培养条件设置为光照强度100 μmol/m<sup>2</sup>·s<sup>-1</sup>,光照期16 h光照/8 h黑暗,温度应控制在(22±1) °C。3~4天后取下保鲜膜,待7天后间苗,培养盒的每个角留一株苗,留取长势最好的苗即可。为了保证能获得足够的不同发育时期的角果材料,可间隔1周再种植一批苗。

### 3.2 实验试剂的配制

(1) 固定剂:乙醇(ethanol):冰醋酸(acetic acid)=3:1。

(2) 透明剂(100 mL):67 g水合氯醛(chloral hydrate)、25 mL ddH<sub>2</sub>O、8.3 mL甘油(glycerol),完全溶解后用1 mol/L NaOH调节pH至5.5。

### 3.3 拟南芥幼苗的取材

将MS培养基上生长7天的幼苗移至12孔板(每孔提前加1 mL固定剂),注意使用镊子尖端挑起子叶即可,不要损伤根部。

### 3.4 拟南芥花和角果取材和解剖

待拟南芥生长6~8周后,分别取不同时期的花蕾,在体式显微镜(解剖镜)下用镊子将花瓣、萼片、雄蕊去除,只留雌蕊,将雌蕊置于12孔板(提前加入1 mL固定剂)中。需注意不同时期雌蕊要分开放置,并做好标记。



待拟南芥生长6~8周后, 分别收集开花后1~8天的角果, 将角果固定于粘有双面胶的载玻片上, 在体式显微镜下用镊子沿着角果中轴, 将角果皮撕开至内部的种子完全暴露出来, 随后用镊子小心夹取<sup>[12]</sup>, 并将种子转移至12孔板(提前加入1 mL固定剂)中。需要注意的是, 不同时期角果的种子要分开放置, 并做好标记。

### 3.5 拟南芥幼苗、雌蕊和种子的固定和透明

将加有样品的12孔板置于脱色摇床, 以便样品与固定剂充分接触。固定10~14 h后, 将固定剂吸出, 用ddH<sub>2</sub>O清洗3次, 每次5 min, 注意吸取溶液时速度要慢, 尽量不要将样品吸走或损伤样品。清洗过后, 于样品中加入1 mL透明剂, 随后置于脱色摇床上透明3~5天(透明时间可根据实际情况判定, 中间可以更换新的透明剂)。

### 3.6 制片及显微镜观察

**侧根的制片与观察:** 首先使用移液枪吸取适量透明剂至载玻片, 随后用镊子挑起拟南芥幼苗, 将幼苗伸展开, 置于载玻片上透明剂中, 加盖盖玻片。于高级正置显微镜20×物镜下, 选用微分干涉模式(differential interference contrast, DIC)观察并拍照。

**胚珠的制片与观察:** 取不同时期的雌蕊置于载玻片, 于体式显微镜下将雌蕊剥开, 取出胚珠, 加适量透明剂, 加盖盖玻片。于高级正置显微镜60×油镜下, 选用DIC模式观察并拍照。

**胚的制片与观察:** 首先用剪刀剪去枪头的尖端(避免枪头过尖损伤种子形态), 随后使用移液枪吸取含有种子的透明剂至载玻片, 注意液体不宜过多, 以免材料溢出盖玻片外或种子在视野下不断流动, 加盖盖玻片。于高级正置显微镜20×物镜下, 选用DIC模式观察并拍照。

注意盖盖玻片时不要产生气泡, 用吸水纸吸净盖玻片周围多余液体, 防止污染镜头。

## 4 实验结果

拟南芥的侧根发育可分为八个时期: 第I期为建成细胞垂周分裂形成单细胞层(图1A); 第II期为单细胞层平周分裂形成双层细胞(内层细胞和外层细胞, 图1B); 第III期为外层细胞发生平周分裂, 形成三层细胞(图1C); 第IV期为内层细胞平周分裂形成侧根原基(图1D); 第V期为内外层细胞不断进行平周分

裂, 使侧根原基突破内皮层(图1E); 第VI期为侧根原基突破皮层(图1F); 第VII~VIII期为侧根原基突破表皮形成侧根(图1G)<sup>[17]</sup>。

我们对不同时期雌蕊进行了固定透明, 然后将其中的胚珠剥出进行显微镜观察, 结果如图2所示。首先是大孢子母细胞时期(图2A); 而后大孢子母细胞减数分裂形成四个大孢子, 最终三个大孢子退化, 仅留一个功能性大孢子, 为FG1期(图2B); 功能性大孢子进行有丝分裂, 产生有两个核的胚囊, 为FG2期(图2C); 而后胚囊中小液泡聚集形成中央液泡, 将两个核分隔开, 一个靠近珠孔, 一个靠近合点端, 为FG3期; 两个核分别进行有丝分裂, 形成具有四个核的胚囊, 为FG4期(图2D); 随后四个核分别进行有丝分裂, 产生八个核, 为FG5期。此时, 配子体开始细胞化, 形成七细胞八核的胚囊, 珠孔端包含两个助细胞和一个卵细胞, 合点端有三个反足细胞, 胚囊中央为具有两个极核的中央细胞, 为FG6期(图2E); 在FG7期中央细胞的两个极核融合, 反足细胞退化, 最终形成含有两个助细胞、一个卵细胞和一个二倍体中央细胞的成熟雌配子体(图2F)。

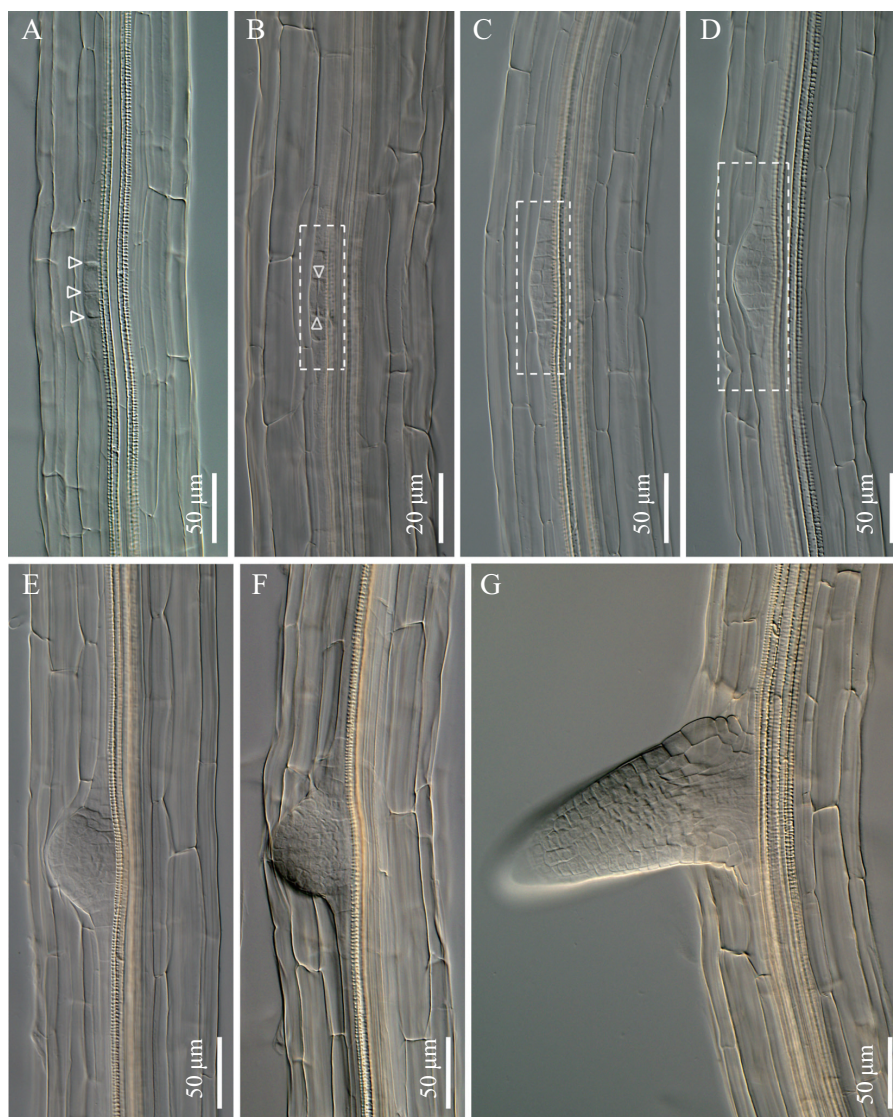
我们将拟南芥开花后1~8天角果中的种子进行了固定透明, 并通过显微镜对胚的发育过程进行观察, 结果如图3和图4所示。

图3所示的是胚胎早期的发育过程, 首先是合子胚经过第一次不对称分裂形成的一个较小的顶细胞和一个较大的基细胞<sup>[18-20]</sup>, 为1细胞期(图3A)。随后顶细胞经历两次纵向分裂产生有四个细胞的胚体, 为4细胞期(图3B)。4细胞期的胚体细胞再经过一次横向分裂产生具有八个细胞的胚体, 为8细胞期(图3C)。随后再经过多次的细胞分裂与分化, 经历16细胞期(图3D)、32细胞期(图3E)、球型期(图3F)、过渡期(图4A)、心型期(图4B)、鱼雷期(图4C)、拐杖期(图4D), 最终发育为具有子叶、茎尖分生组织、下胚轴和根尖分生组织的成熟胚(图4E)<sup>[21-22]</sup>。而由基细胞发育而来的胚柄细胞, 则在心型期后开始退化<sup>[22]</sup>。

## 5 讨论

### 5.1 开设该实验项目的意义

植物的生长发育是从受精卵的第一次分裂开始, 经过胚胎发育、种子萌发、营养体形成、生殖体形成、开花、受精和结实等阶段, 直至衰老和死亡。



A: I期; B: II期; C: III期; D: IV期; E: V期; F: VI期; G: VIII期。虚线框为侧根起始部位, 箭头为细胞壁。

A: I stage; B: II stage; C: III stage; D: IV stage; E: V stage; F: VI stage; G: VIII stage. Dashed box indicates the location of lateral root primordium, and arrow head indicates cell wall.

图1 拟南芥的侧根发育过程

Fig.1 Lateral root development in *Arabidopsis*

而这每一个发育过程都是独特的, 值得科研工作者去研究。在研究过程中, 有许多的现象是不能用肉眼观察到的, 比如侧根、花粉、胚珠和胚胎的发育等, 这就需要借助于显微镜, 有时植物组织较厚透光性差, 则需借助于组织透明技术或者切片技术。该实验课程将组织透明技术与显微镜观察相结合, 可以帮助同学们更直观地观察到模式植物拟南芥的侧根、胚珠和胚胎的发育过程, 以及各个时期的器官形态。因此, 建议将这一实验项目加入到本科教学的实验中, 这样不仅能够激发学生对科研的兴趣, 也

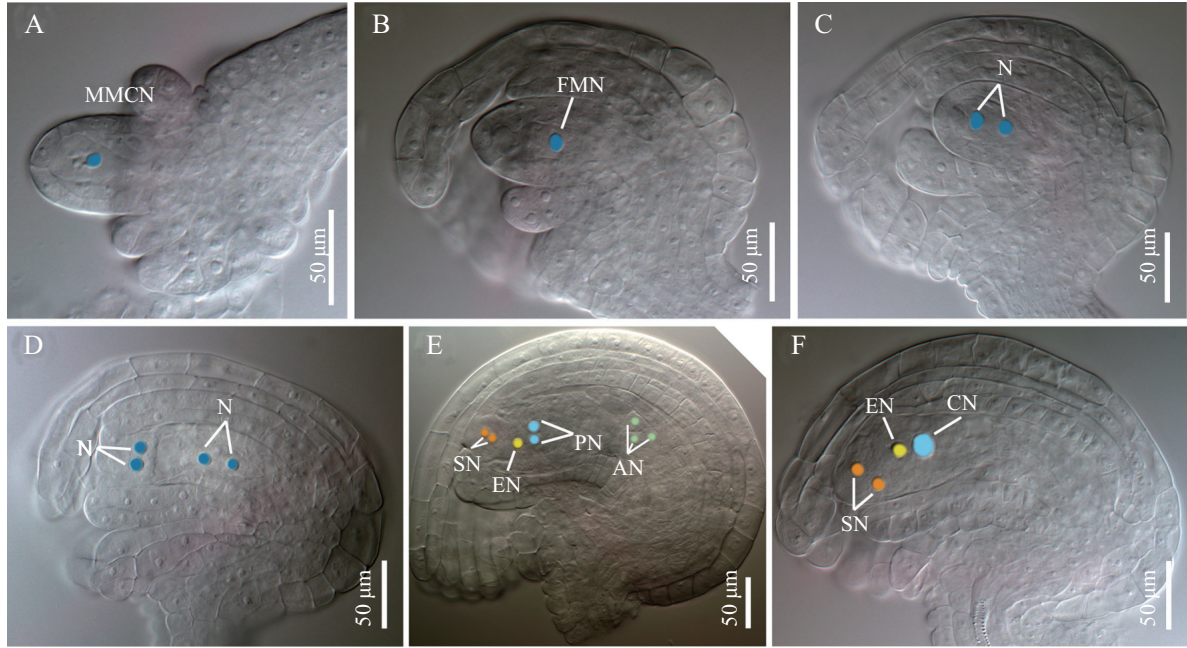
能够锻炼学生的自主操作能力, 还能使学生更深入地了解并认识植物的生长发育过程, 加深对理论知识理解。同时, 经过此次实验课程的学习, 学生能独立完成实验所需试剂的配制、胚珠解剖、组织透明以及显微镜观察等实验操作。

## 5.2 该实验项目的教学定位

(1) 对于低年级的本科生, 前期的材料准备, 样品的取材、固定透明及制片可由教师完成, 学生只负责显微镜观察, 4学时即可完成。

(2) 如果用于三年级或者四年级本科生的综合



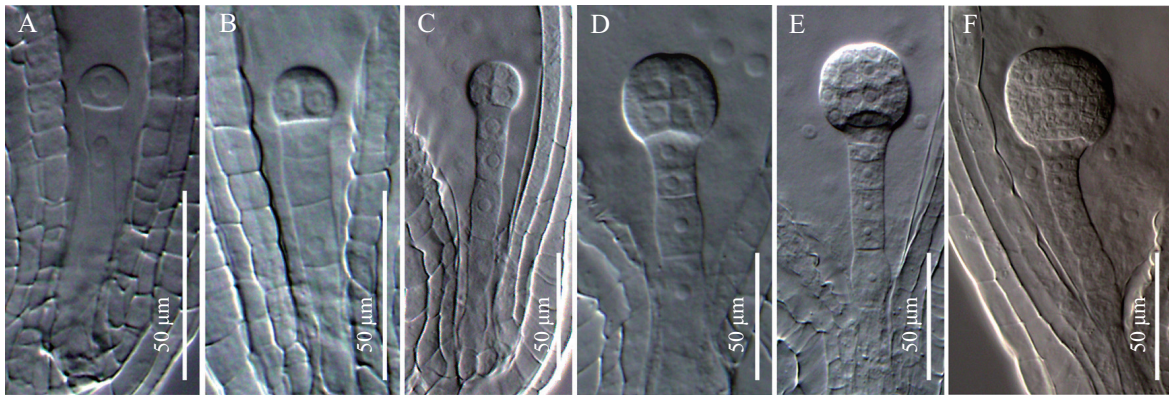


A: 大孢子母细胞; B: FG1期; C: FG2期; D: FG4期; E: FG5期; F: FG7期。MMCN: 大孢子母细胞核; FMN: 功能性大孢子细胞核; N: 细胞核; SN: 助细胞核; EN: 卵细胞核; PN: 极核; AN: 反足细胞核; CN: 中央细胞核。

A: MMC; B: FG1 stage; C: FG2 stage; D: FG4 stage; E: FG5 stage; F: FG7 stage. MMCN: megaspore mother cell nuclei; FMN: functional megaspore cell nuclei; N: cell nuclei; SN: synergid cell nuclei; EN: egg cell nuclei; PN: polar nuclei; AN: antipodal cell nuclei; CN: central cell nuclei.

图2 拟南芥的雌配子体发育过程

Fig.2 Female gametophyte development in *Arabidopsis*



A: 1细胞期; B: 4细胞期; C: 8细胞期; D: 16细胞期; E: 32细胞期; F: 球型期。

A: 1-cell stage; B: 4-cell stage; C: 8-cell stage; D: 16-cell stage; E: 32-cell stage; F: globular stage.

图3 拟南芥发育早期的胚胎

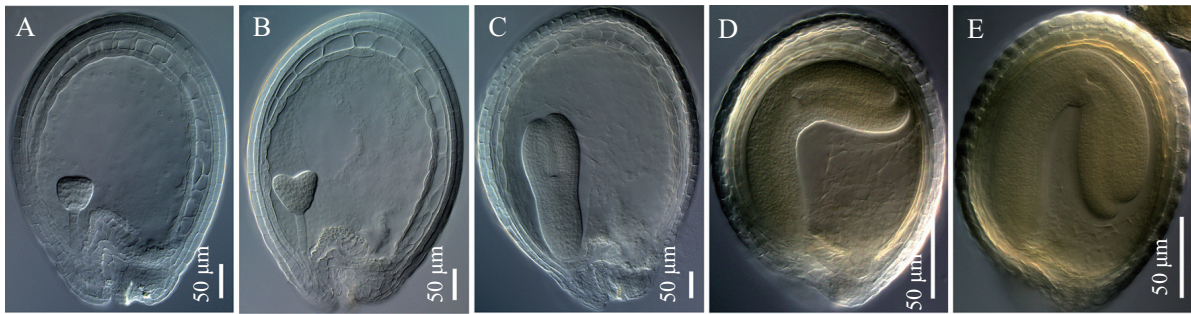
Fig.3 The *Arabidopsis* embryos at early developmental stages

性大实验课程, 前期的植物材料播种和培养可由教师完成, 后期的样品解剖、固定、透明、制片及显微镜观察由学生完成, 课时为32~48学时。

(3) 对于本科生开放实验课程, 前期的材料准备、样品取材及固定透明可在其课余时间完成, 而制片及显微镜观察由于需要较长的时间, 最好安排3~4学时进行。开放实验没有具体的学时规定, 学生可以进行反复练习, 以便获得满意的实验结果。

### 5.3 实验安排的可行性

该实验项目经过本实验室研究生及本科生的反复验证, 实验步骤操作简单, 实验结果容易获得。本实验涉及的实验技术有显微镜下花和角果的解剖, 拟南芥幼苗、雌蕊和种子的组织透明, 显微镜制片及观察等, 很多高校具备开设本实验项目的实验条件。本实验项目可以让学生在原有的基础上, 更深层次地认识植物组织器官的发育过程, 增加对细



A: 过渡期; B: 心型期; C: 鱼雷期; D: 拐杖期; E: 成熟期。

A: transition stage; B: heart stage; C: torpedo stage; D: bent stage; E: mature stage.

图4 拟南芥发育后期的胚胎

Fig.4 The *Arabidopsis* embryos at late developmental stages

胞分裂分化的认识。

该实验项目对于不同阶段的学生们的可调节性较高,可以根据本科生的年级和学时安排来调节由学生完成的实验步骤。该实验项目作为综合实验课程,可以在2周内完成,也可以在作为开放实验一学期内完成所有实验内容,课余时间,学生可以在老师或助教的指导下完成实验,于学期末进行结果展示并上交实验报告。该实验虽然周期较长,但不需要太大的连贯性,没有每天定时定点的要求,因此,学生能更自由地支配自己的时间。因此,比较适合作为本科生综合实验课程。如果将本实验作为拓展训练项目或者科研训练项目开展,除了以上的实验安排之外,还可以将组织切片技术与之结合,这样可以帮助同学们观察更细微的结构。另外,还可以与遗传学相结合,来观察野生型胚胎与某胚胎发育缺陷突变体胚胎之间的差异,来帮助同学们认识该基因在胚胎发育中发挥的作用。

#### 5.4 该实验的推广与应用

(1) 实验条件: 具备植物可生长的环境即可,有植物培养箱或培养室最佳,具备显微镜。

(2) 课时的安排: 依据不同阶段学生所需的训练时长及训练内容可自行选择所进行的实验步骤。

(3) 教师的要求: 指导教师应熟悉侧根、胚囊和胚的发育过程,并熟练掌握显微镜操作技术。

(4) 相关应用: 可在已开设植物组织显微结构观察等相关实验的院校推广应用。

#### 参考文献 (References)

- [1] ZHANG X, SUN S, NIE X, et al. Sterol methyl oxidases affect embryo development via auxin-associated mechanisms [J]. *Plant Physiol*, 2016, 171(1): 468-82.
- [2] BAO S, SHEN G, LI G, et al. The *Arabidopsis* nucleoporin NUP1 is essential for megasporogenesis and early stages of pollen development [J]. *Plant Cell Rep*, 2019, 38(1): 59-74.
- [3] SONG J, SUN S, REN H, et al. The SMO1 family of sterol 4 $\alpha$ -methyl oxidases is essential for auxin-and cytokinin-regulated embryogenesis [J]. *Plant Physiol*, 2019, 181(2): 578-94.
- [4] VILCHES-BARRO A, MAIZEL A. Talking through walls: mechanisms of lateral root emergence in *Arabidopsis thaliana* [J]. *Cur Opin Plant Biol*, 2015, 23: 31-8.
- [5] DOLAN L, JANMAAT K, WILLEMSSEN V, et al. Cellular organisation of the *Arabidopsis thaliana* root [J]. *Development*, 1993, 119(1): 71-84.
- [6] SMET I D, VANNESTE S, DIRK INZÉ, et al. Lateral root initiation or the birth of a new meristem [J]. *Plant Mol Biol*, 2006, 60(6): 871-87.
- [7] TATSUAKI G, KOICHI T, DARREN M W, et al. Quiescent center initiation in the *Arabidopsis* lateral root primordia is dependent on the scarecrow transcription factor [J]. *Development*, 2016, 143(18): 3363-71.
- [8] TEKLEYOHANS D G, NAKEL T, GROB-HARDT R. Patterning the female gametophyte of flowering plants [J]. *Plant Physiol*, 2017, 173(1): 122.
- [9] DREWS G N, KOLTUNOW A M G. The female gametophyte [J]. *Arabidopsis Book*, 2011, 9: e0155.
- [10] SKINNER D J, SUNDARESAN V. Recent advances in understanding female gametophyte development [J]. *F1000 Res*, 2018, 7: 804.
- [11] GOLDBERG R B, DE PAIVA G, YADEGARI R. Plant embryogenesis: zygote to seed [J]. *Science*, 1994, 266(5185): 605-14.
- [12] KÄGI C, GROSS-HARDT R. How females become complex: cell differentiation in the gameto-phyte [J]. *Curr Opin Plant Biol*, 2007, 10(6): 633-8.
- [13] HERR J M. A new clearing-squash technique for the study of ovule development in angiosperms [J]. *Am J Botany*, 1971, 58(8): 785-90.
- [14] HERR J M. An analysis of methods for permanently mounting ovules cleared in four-and-a-half type clearing fluids [J]. *Stain Technol*, 1982, 57(3): 161-9.
- [15] ZHANG Y, MULLER M, XU B, et al. Unrestricted modification search reveals lysine methylation as major modification induced by tissue formalin fixation and paraffin embedding [J]. *Proteomics*,

- 2015, 15(15): 2568-79.
- [16] BERLETH T, JURGENS G. The role of the *monopteros* gene in organising the basal body region of the *Arabidopsis* embryo [J]. *Development*, 1993, 118(2): 575-87.
- [17] BENJAMIN P, RYBEL B D, CASIMIRO I, et al. *Arabidopsis* lateral root development: an emerging story [J]. *Trends Plant Sci*, 2009, 14(7): 399-408.
- [18] JÜRGENS G. Apical-basal pattern formation in *Arabidopsis* embryogenesis [J]. *EMBO J*, 2001, 20(14): 3609.
- [19] LAU S, SLANE D, HERUD O, et al. Early embryogenesis in flowering plants: setting up the basic body pattern [J]. *Annual Rev Plant Biol*, 2012, 63(1): 483-506.
- [20] DE VRIES S C, WEIJERS D. Plant embryogenesis [J]. *Curr Biol*, 2017, 27(17): R870-3.
- [21] WENDRICH J R, WEIJERS D. The *Arabidopsis* embryo as a miniature morphogenesis model [J]. *New Phytol*, 2013, 100(1): 14-25.
- [22] KAWASHIMA T, GOLDBERG R B. The suspensor: not just suspending the embryo [J]. *Trends Plant Sci*, 2010, 15(1): 30.